



TITLE:

Src regulates insulin secretion and glucose metabolism by influencing subcellular localization of glucokinase in pancreatic  $\beta$ -cells( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Sato, Hiroki

---

CITATION:

Sato, Hiroki. Src regulates insulin secretion and glucose metabolism by influencing subcellular localization of glucokinase in pancreatic  $\beta$ -cells. 京都大学, 2016, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2016-11-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r13062>

RIGHT:

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	佐 藤 広 規
論文題目	Src regulates insulin secretion and glucose metabolism by influencing subcellular localization of glucokinase in pancreatic β-cells (Src は膵β細胞においてグルコキナーゼの細胞内局在への影響を介してインスリン分泌とグルコース代謝を制御する)		
(論文内容の要旨)			
<p>膵β細胞はグルコース濃度依存的にインスリンを分泌する。その機序として、解糖系とミトコンドリアにおけるグルコース代謝およびATP産生が重要であり、ATPの増加は、ATP感受性カリウムチャネルを閉鎖し、脱分極、Ca<sup>2+</sup>流入をもたらし、その刺激によってインスリンが開口放出される。一方で、慢性高血糖に起因する酸化ストレスはグルコース代謝障害およびインスリン分泌障害の重要な原因の一つである。非受容体型チロシンキナーゼである Src は多種の動物細胞に発現しており、細胞増殖や癌化など多様な生理的、病態生理的な機能を制御している。糖尿病モデル Goto-Kakizaki ラットの膵β細胞では、Src の過剰活性化が、酸化ストレスによるグルコース代謝障害を介してインスリン分泌障害に関与することが報告されている。しかし、生理的条件・非ストレス下において、膵β細胞のグルコース代謝およびインスリン分泌における Src の機能は明らかにされていない。本研究では、生理的条件・非ストレス下での Src のグルコース代謝およびインスリン分泌における役割について、グルコース応答性インスリン分泌が良好なラットインスリノーマ細胞株である INS-1 細胞を用いて検討した。</p> <p>Src 特異的な siRNA または陰性対照の siRNA をリポフェクション法で INS-1 に導入した。siRNA による Src 発現抑制効果は 48 時間培養後に半定量 RT-PCR 法、immunoblotting 法で確認した。Src を発現抑制した INS-1 では、対照群と比較して高濃度グルコース (10mM) 応答性のインスリン分泌は低下したが高カリウム (30mM) 脱分極刺激によるインスリン分泌は低下しなかった。また、10mM グルコース刺激時の細胞内 ATP 含量増加、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇も対照群と比較して抑制されていた。高カリウム刺激による細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇も抑制されたものの、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の振幅頻度や反応速度などはグルコース刺激時の影響に比べて軽微であった。Src の特異的阻害薬 PP2 の 48 時間暴露においても、グルコース応答性インスリン分泌が低下した。以上より、Src の発現抑制は ATP 産生より上流でグルコース代謝を抑制していると考えられた。</p> <p>続いて、解糖系とミトコンドリアに関する検討を行った。Src 発現抑制により、解糖系でのグルコース利用および律速酵素であるグルコキナーゼ (glucokinase; GK) の活性が低下した。一方、ミトコンドリア分画での ATP 産生およびミトコンドリア呼吸差蛋白 (複合体 I、III、IV、V) の発現量は有意な影響を受けなかった。</p> <p>次に、Src の GK 活性および GK 発現への影響について検討した。Src の発現抑制により GK 活性が低下したにも関わらず、GK 発現量は変化が無かった。GK の活性調節機構の一つとして、インスリン顆粒膜に結合した GK が遊離し、細胞質に移行することで活性が上昇することが報告されている。この細胞内局在に関して、INS-1 を、ジギトニン処理後に遠心分離し、上清 (細胞質) と沈殿 (膜分画) に分離し、各分画での GK 量を Immunoblotting 法にて解析した。Src の発現抑制により上清における GK 量が減少し、沈殿における GK 量が増加した。また、GK はインスリン顆粒膜上で神経型一酸化窒素合成酵素 (neuronal nitric oxide synthase; nNOS) と結合・遊離することで局在が変化するという報告がある。GK と nNOS の結合を免疫沈降法によって評価したところ、Src の発現抑制により GK と nNOS の結合が増加していた。</p>			

以上の結果より、Src は、GK の活性制御を介して、膵β細胞におけるグルコース代謝およびインスリン分泌調節に関与することが示された。また、その機序として GK と nNOS の結合状態の変化および GK の細胞内局在の変化の関与が示唆された。
（論文審査の結果の要旨）
糖尿病 Goto-Kakizaki ラット膵β細胞では、Src が過剰活性化しており、酸化ストレスによるグルコース代謝障害、インスリン分泌障害を呈することが報告されている。一方で、Src の生理的なインスリン分泌機構における役割は明らかにされていない。本論文では、siRNA により Src を発現抑制した INS-1 細胞を用いて、Src のグルコース代謝およびインスリン分泌機構における役割を検討した。
Src の発現抑制により、グルコース応答性の細胞内 ATP 含量上昇、細胞内 Ca <sup>2+</sup> 濃度上昇、インスリン分泌が抑制された。さらに、解糖系でのグルコース利用およびグルコキナーゼ（glucokinase; GK）活性が低下した。しかし、GK 発現量は変化が無かった。
GK 活性調節について、蛋白翻訳後の調節機構を検討した。GK は神経型一酸化窒素合成酵素（neuronal nitric oxide synthase; nNOS）と結合し、膜分画に存在すると活性が低下すると考えられている。Src の発現抑制により細胞質分画における GK 量が減少し、膜分画における GK 量が増加した。また、GK との結合も、Src 発現抑制により増加した。
以上の結果より、Src は GK の活性制御を介して、膵β細胞におけるグルコース代謝およびインスリン分泌調節に関与することが示された。また、その機序として GK と nNOS の結合状態の変化および GK の細胞内局在の変化の関与が示唆された。
以上の研究は膵β細胞における Src の機能およびグルコース応答性インスリン分泌機構の解明に貢献し、糖尿病学の発展に寄与するところが多い。
したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。
なお、本学位授与申請者は、平成 28 年 9 月 21 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降